

3. マイナス鎖 RNA ウイルスの細胞侵入と抗体による中和の研究

橋口 隆生

九州大学 大学院医学研究院

麻疹（はしか）を起こす麻疹ウイルスと流行性耳下腺炎（ムンプス・おたふくかぜ）を起こすムンプスウイルス、出血熱を起こす場合があるエボラ・マールブルグウイルスは、いずれもマイナス鎖一本鎖の RNA をゲノムとするエンベロップウイルス（モノネガウイルス）である。これらのウイルスがどのようなメカニズムで細胞へ侵入し、また、抗体により中和されるかは未解明なことが多い。我々は、ウイルス学的手法と構造生物学的手法を組み合わせることにより、その全容を解明すべく取り組んでいる。本稿では、上記ウイルスの糖蛋白質と受容体または抗体との相互作用を介した細胞侵入と中和に関する現在の知見を我々の研究成果を中心に概説する。

はじめに

麻疹（はしか）を起こす麻疹ウイルスと流行性耳下腺炎（ムンプス・おたふくかぜ）を起こすムンプスウイルスは、共にパラミクソウイルス科に属するウイルスでヒトに対して急性の呼吸器感染を起こす。麻疹ウイルスは高い伝播力と一過性の強い免疫抑制を引き起こすことで肺炎や脳炎などの重篤な合併症を呈することがある¹⁾。また、感染後、数年を経て数万人に一人の割合で持続感染による重急性硬化性全脳炎（SSPE）を発症することがある¹⁾。効果的な弱毒生ワクチンがあるにも関わらず、いまだに世界全体で毎年約 2000 万人の感染者と 13 万人以上の死亡者を出している²⁾。ムンプスウイルスに関しても弱毒生ワクチンがあるが、低頻度ながら無菌性髄膜炎（0.01-0.1%）やムンプス脳炎（0.0004%）などの副反応が報告されている³⁾。この副反応によりムンプスワクチンは定期接種から任意接種へと変更になり、現在、本邦のワクチン接種率は 30% 程度と低く、およそ 4 年に一度の全国規模の流行を今も繰り返し、社会問題となっている。自然感染では発熱と耳下腺腫

脹を主症状とし、神経指向性が強く、罹患すると髄膜炎や脳炎、難聴といった重篤な合併症を引き起こすことがあるため流行の制御が課題となっている³⁾。

マールブルグウイルス病・エボラウイルス病を引き起こすマールブルグウイルス・エボラウイルスは、共にフィロウイルス科に属するウイルスでヒトに対して極めて致死率の高いウイルス性出血熱を伴う場合があるため、その取り扱いには Bio Safety Level 4 (BSL4) に分類される⁴⁾。マールブルグウイルスは 2004-2005 年にアンゴラ共和国で最大規模の流行を記録しており、その際の感染者は 252 人、致死率は 90% に達したと報告されている⁴⁾。エボラウイルスは、記憶にも新しいが 2014-2015 年にかけて西アフリカ 3 カ国を中心に最大規模の流行を起こした。収束宣言が出された時点の感染者は 28,646 人、死者 11,323 人に達し（2016 年 6 月時点⁵⁾、それまでの 40 年ほどの間に起きた流行の中で最大規模だった 2000-2001 年のウガンダでの感染者 425 人、致死率 53% をはるかに上回る流行の拡大によって⁴⁾、世界中で社会的な関心が非常に高まる結果となった。このエボラウイルスの流行では、緊急事態として承認前の複数の治療措置を WHO が認めたが、その中には 3 種類の抗体のカクテルである ZMapp や生存者由来の血清など^{6,7)}、中和抗体による感染防御を期待した治療法が含まれていた。

麻疹ウイルスの細胞侵入

麻疹ウイルスはパラミクソウイルス科モルビリウイルス属に分類されるマイナス鎖一本鎖 RNA ウイルスで、エンベロップ（脂質二重膜）上に 2 つの糖蛋白質（受容体結合

連絡先

〒 812-8582

福岡県福岡市東区馬出 3-1-1 総合研究棟 823

九州大学 大学院医学研究院 ウイルス学

TEL: 092-642-6138

FAX: 092-642-6140

E-mail: takaoh@virology.med.kyushu-u.ac.jp

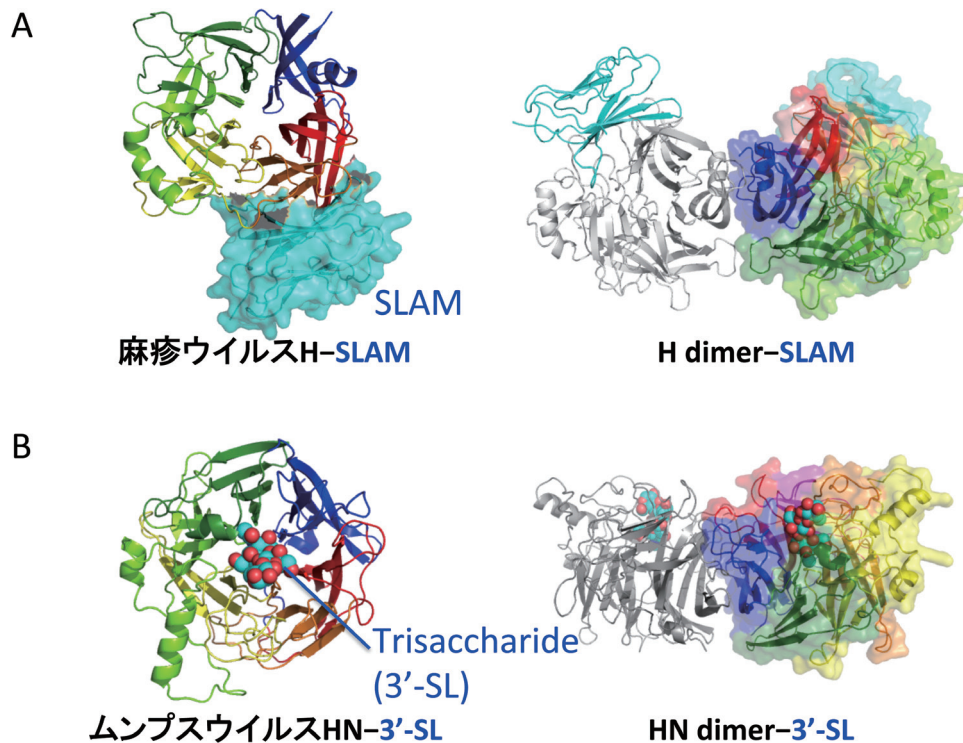


図1 麻疹ウイルス H 蛋白質と受容体 SLAM, ムンプスウイルス HN 蛋白質と受容体 (3'-SL) の X 線結晶構造

麻疹ウイルス H 蛋白質 (A) とムンプスウイルス HN 蛋白質 (B) は共に 6 つの羽根を持つプロペラ状の構造 (β -propeller 構造) を示すが, その受容体認識は大きく異なる. 麻疹ウイルス H 蛋白質は β -propeller 構造の側面で受容体と結合し (PDB ID; 3ALZ, 3ALW, 3ALX), ムンプスウイルス HN 蛋白質は β -propeller 構造の上部中央のポケットで受容体を認識する (PDB ID; 5B2D). H/HN 蛋白質の 2 量体構造の配向も大きく異なる. 麻疹ウイルス H 蛋白質はほぼ水平方向に倒れこむような配向を示し, ムンプスウイルス HN 蛋白質は 90 度程度の傾きの配向となっている. 左: 単量体を上から見た図, 右: 2 量体を側面から見た図.

能を担う H 蛋白質と膜融合能を担う F 蛋白質) を持ち, 受容体結合に伴い, H 蛋白質と F 蛋白質が協調して構造を変化させることで細胞内へと侵入すると考えられている¹⁾. 麻疹ウイルスの受容体としては九州大学ウイルス学教室で同定された免疫系細胞に特異的に発現する SLAM と⁸⁾, 上皮系細胞に特異的に発現する Nectin-4 が報告されている^{9,10)}. SLAM を受容体とすることで麻疹ウイルスの免疫細胞指向性が分子レベルで理解され, 感染時にみられる一過性の免疫抑制もこれに起因すると考えられる¹¹⁾. ヒト体内での感染の広がりメカニズムとしては, まず SLAM を介した免疫系細胞への感染で全身へと広がり, 最終的に Nectin-4 を介して気道内腔側へと放出されることにより次の個体へと伝播していくと考えられている^{1,12,13)}. その他, ワクチン株のみが使用できる受容体として CD46 も報告されているが^{14,15)}, 臨床分離株は使用できない¹⁾.

我々は 2007 年と 2011 年に X 線結晶構造解析を用いることで, H 蛋白質の受容体結合ドメインの構造を単独で¹⁶⁾, さらに, H 蛋白質と受容体 SLAM の複合体構造を決定することに成功した¹⁷⁾. H 蛋白質は 617 アミノ酸で構成さ

れる II 型の膜タンパク質で, 受容体結合ドメインは 6 つの羽根を持つプロペラ状の構造 (β -propeller 構造) をしていた (図 1A). この基本骨格は後述するムンプスウイルスを含めたパラミクソウイルスの受容体結合蛋白質に共通して見られる構造であった. 麻疹ウイルスに特徴的な点として, その他のパラミクソウイルス受容体結合蛋白質は β -propeller 構造の上部中央領域 (受容体結合ポケット) で受容体と結合するのに対し, 麻疹ウイルス H 蛋白質は β -propeller 構造の外側面で受容体と結合することが明らかとなった (図 1A)¹⁸⁾. また, 麻疹ウイルス H 蛋白質は外側面で受容体と効率的に結合できるように, 2 量体間の配向を単量体同士が互いに水平面方向に大きく傾いているなど他のパラミクソウイルスとは明らかに異なる高次構造を示す¹⁶⁾.

H 蛋白質と SLAM の複合体構造では, 2 種類の 4 量体構造 (Form I と Form II) が観察され, 両者間の構造変化が麻疹ウイルスの細胞侵入にとって重要な膜融合の trigger となっていることが示唆された¹⁷⁾. 実際, 構造に基づき Form I もしくは Form II のどちらかを形成できな

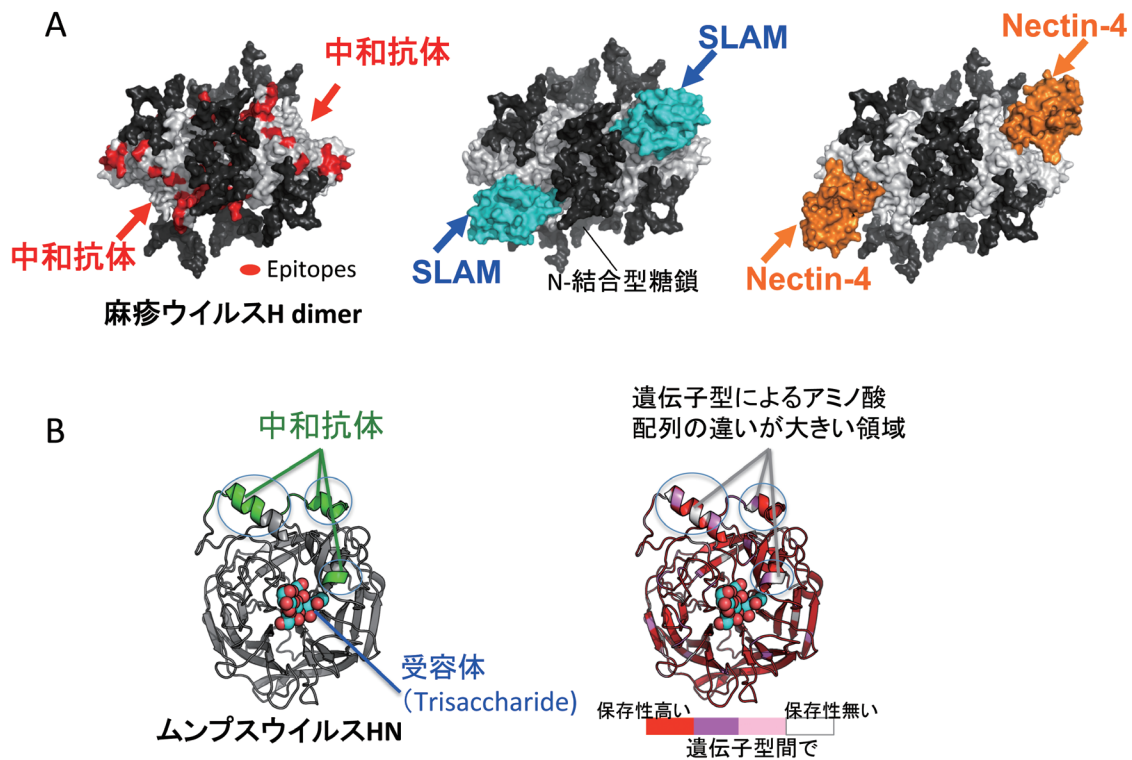


図2 抗体による麻疹・ムンプスウイルス中和の構造基盤

(A) 麻疹ウイルス H 蛋白質は糖鎖による影響と、二量体間の配向が大きく傾いていることで受容体結合部位に集中的に抗体が出来やすい構造をしていた。抗体からエスケープすることは受容体 (SLAM/Nectin-4) 結合能を失うことになるので、容易に変異出来ないことが効果的な麻疹ワクチンの構造基盤であると考えられる。(B) ムンプスウイルスは 12 種類の遺伝子型で分類されるが、ムンプスウイルス HN 蛋白質のアミノ酸配列の違いが特に大きいアルファヘリックス領域に抗体が出来やすい構造をしている。すなわち、抗体がウイルス感染を阻害できる全ての遺伝子型に共通で重要な部位に出来にくい構造的な特徴が確認された。このことが、ワクチンを受けた人がムンプスウイルスに感染する、また、一度流行性耳下腺炎になった人が再感染してしまう構造的な理由と考えられる。

くした変異体解析により、これらの変異体では Wild type の H 蛋白質と比較して細胞表面発現・受容体との結合能・F 蛋白質との相互作用能に変化はなかったが、膜融合能のみに大幅な低下が認められた¹⁹⁾。F 蛋白質との直接の相互作用は H 蛋白質の stalk 領域が担っていると考えられているので、受容体結合に伴って、H 蛋白質の受容体結合ドメインの 4 量体構造に変化が生じ、それが stalk 領域の構造にも変化をもたらすことで膜融合の trigger が引かれると思われる。

ムンプスウイルスの細胞侵入

ムンプスウイルスはパラミクソウイルス科ブラウイルス属に分類されるマイナス鎖一本鎖 RNA ウイルスで、麻疹ウイルスと同様にエンベロープ上に 2 つの糖蛋白質 (受容体結合能を担う HN 蛋白質と膜融合能を担う F 蛋白質) を持ち、受容体結合に伴い、HN 蛋白質と F 蛋白質が連鎖的に構造を変化させることで細胞内へと侵入すると考えら

れている³⁾。気道粘膜で増殖した後に所属リンパ節から全身に広がり、唾液腺、髄膜、精巣、膵臓などを主な標的臓器とする。感染後は耳下腺炎をはじめとする腺組織での炎症が起こりやすい。現在、このような組織障害と組織指向性がどのような分子機構によってもたらされるのかは明確ではない。そこで、我々はウイルスが細胞に感染する際の最初の過程である細胞侵入機構をウイルス学的手法と構造生物学的手法により解析することで、ムンプスウイルスの組織指向性の分子機構を解明することを目的に研究を進めている。

ムンプスウイルスの受容体はこれまで漠然とシアル酸と言われていたが、我々の研究により 2016 年に単純なシアル酸単体ではなく、非分岐型糖鎖上に存在する α 2,3- 結合型シアル酸を含む 3 糖構造 [シアル酸-ガラクトース-グルコース (N-アセチルグルコサミン)] が受容体として機能することが明らかとなった²⁰⁾。興味深い点として、この 3 糖構造を多く含んだ糖鎖 (分岐型の糖鎖) であれば

表 1

受容体結合蛋白質	受容体	標的組織	主要中和抗体	主要エピトープ
麻疹ウイルスH (6-bladed β propeller)	SLAM, Nectin-4, (CD46)	リンパ系・上皮 系組織	抗受容体結合部 位抗体	保存性高い
ムンプスウイルス HN (6-bladed β propeller)	Trisaccharide containing α 2,3- SIA	神経・腺組織	非受容体結合部 位抗体	保存性低い

より結合性が高まるわけではなく、直鎖状（非分岐型）の糖鎖の方がより強い結合性を示す結果であった。また、シアル酸の存在は必要条件ではあるが十分条件ではなく、非還元末端から3糖目に当たるグルコースまたはN-アセチルグルコサミンとHN蛋白質との相互作用が受容体機能に極めて重要であることが分かった。この3糖目の糖鎖はHN蛋白質上のY369側鎖及びV427の主鎖と相互作用をしており、その重要性は感染実験、結合実験、熱力学的解析、コンピュータ計算のいずれにおいても確認された。さらに、ムンプスウイルスHN蛋白質上のY369に相当する芳香族性のアミノ酸が多くパラミクソウイルスで保存されており、実際に、パラインフルエンザウイルス2型と5型、及び、センダイウイルスでも該当アミノ酸を変異させると巨細胞形成能が著しく失われる結果となった。

ムンプスウイルスHN蛋白質の受容体結合ドメインは、麻疹ウイルスと同様に6つの羽根を持つプロペラ状の構造（ β -propeller構造）をしており、麻疹ウイルスの項目でも比較したように、 β -propeller構造の上部中央領域（受容体結合ポケット）で受容体と結合する（図1B）²⁰。このムンプスウイルスHN蛋白質でも高次構造として、HN蛋白質の4量体構造が観測されており、その4量体中心にはイオンが存在している。ムンプスムンプスでも麻疹ウイルスと同様に受容体結合ドメインの4量体化が膜融合のtriggerに重要な役割を果たす可能性が示唆される。

抗体による麻疹・ムンプスウイルスの中和

麻疹・ムンプスウイルスのエンベロープ上にはH/HN蛋白質とF蛋白質の2つが存在しているが、中和抗体のほとんどは受容体結合蛋白質（H/HN蛋白質）に対して作られることが報告されている²¹。我々はH/HN蛋白質の構造に基づく研究結果から、自然感染やワクチンにより誘導される中和抗体がどのようなメカニズムで感染阻止を行っているのかを提案している（図2A, B, 表1）^{16,17}。

麻疹ウイルスH蛋白質は他のパラミクソウイルスとは異なる2量体配向を示し、その表面の大部分はN結合型糖鎖に覆われている¹⁶。しかし、一部糖鎖に覆われていない領域があり、この領域が2つの受容体（SLAM,

Nectin-4）結合部位となっている。興味深いことに、この糖鎖に覆われていない受容体結合領域はこれまでに報告されている中和抗体のエピトープが集中する領域ともなっており（図2A）、この領域に抗体が結合すると両方の受容体との結合を効果的に阻害すると考えられる¹⁷。仮に、SLAMもしくは、Nectin-4のどちらか一方だけの結合阻害であっても、SLAMとの結合阻害は全身感染に、Nectin-4との結合阻害は個体間の伝播に影響する。従って、麻疹ウイルスに対して産生される中和抗体は効率的に受容体との結合を阻害する一方、中和抗体からのエスケープ変異はH蛋白質の受容体結合能を低下・消失させることになる。こうしたH蛋白質の構造的な特徴により、麻疹ウイルスは単一血清型で、50年以上前に分離されたウイルス株由来のワクチン接種によって今も全ての野生株に対して効果的な中和抗体が産生され、現在までワクチンからのエスケープ株も出現していないと考えられる。実際、受容体結合領域のアミノ酸配列は麻疹ウイルス株間で極めてよく保存されている¹⁶。

ムンプスウイルスは12種類の遺伝子型に分類され、単一の血清型と考えられておりワクチンの有効性は高いが²²、ポリクローナルレベルでの遺伝子型特異性や^{23,24}、ワクチン接種者での自然感染や自然感染後の再感染も報告されている^{25,26}。その主要因はPrimary vaccine failureとSecondary vaccine failureであると思われるが、HN蛋白質の構造が解明されたことにより、構造的な側面からもその要因の一端を説明できるようになった。これまでに報告されている中和抗体のエピトープをHN蛋白質構造上にマッピングしたところ、受容体結合領域とは少し離れた場所に位置する α ヘリックス上にエピトープが集中していた（図2B）。このことは、抗ムンプスウイルス中和抗体の多くが直接的に受容体結合を阻害しているわけではなく、間接的に細胞侵入を阻害していることを示唆する結果であった。さらに、エピトープが集中するこの α ヘリックスのアミノ酸配列は、ムンプスウイルスの遺伝子型間で、アミノ酸配列の多様性が特に大きい（保存性が低い）領域であった。すなわち、中和抗体がウイルスの細胞侵入を阻害できる全ての遺伝子型に共通で重要な部位に出来にくい

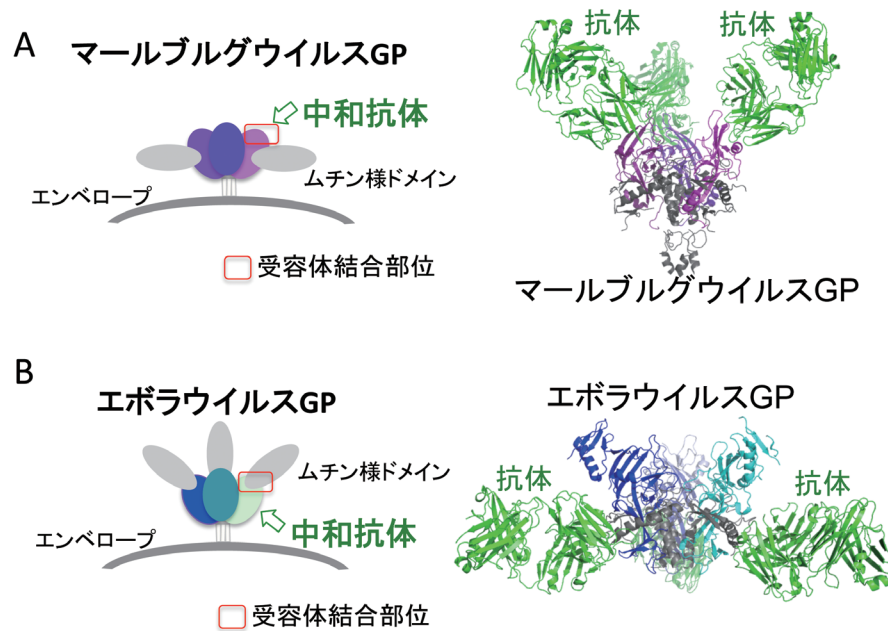


図3 エボラ・マールブルグウイルスGPと中和抗体のX線結晶構造

構造解析の結果、エボラ・マールブルグウイルスGPに対する中和抗体はそれぞれ、膜融合と受容体結合を阻害することが主要な細胞侵入阻害機構であると示唆された。中和機構の違いは、ムチン様ドメインの配置の違いから来ていることがX線小角散乱解析により明らかとなった。(A) エボラウイルスGPと中和抗体KZ52のX線結晶構造(PDB ID;3CSY)、及び、模式図。(B) マールブルグウイルスGPと中和抗体MR78のX線結晶構造(PDB ID;5UQY)、及び、模式図。

という構造的な要因もワクチン接種者での自然感染や自然感染後の再感染の理由の一つであると考えられる。

麻疹・ムンプスウイルスは共にパラミクソウイルス科に属し、弱毒生ワクチンが存在するが、その細胞侵入機構や抗体による中和機構にはいくつかの共通点と多くの違いがあることが近年わかりつつある(表1)。

エボラ・マールブルグウイルスの細胞侵入

エボラ・マールブルグウイルスはフィロウイルス科に分類されるマイナス鎖一本鎖RNAウイルスで、紐状のウイルス粒子構造を特徴とする⁴⁾。エンベロープ上に唯一の糖蛋白質であるGP蛋白質を持ち、GP1とGP2サブユニットで構成され、GP1が受容体結合能を、GP2が膜融合能を担う²⁷⁾。GPは三量体を形成しており、細胞への侵入を担い、かつ、唯一の抗体の標的となる(図3)。両ウイルスのGPはムチン様ドメイン(Mucin-like domain, MLD)を含んでおり両ウイルス間ではMLD配置にも違いがある^{28,29)}。MLDを欠損させたGPであってもVSVシールドタイプウイルスを用いた系では細胞侵入に影響を与えないことから重要性は明確ではないが^{30,31)}、細胞表面への吸着の他³²⁾、細胞傷害作用、MHCクラスI分子を覆い隠すsteric shields、中和抗体に対するsteric shieldsとしての報告もあることから*in vivo*では病原性の発揮に一定の役割を果たしている可能性がある³³⁻³⁵⁾。

エボラ・マールブルグウイルスの細胞侵入の最初のステップとしては、まず細胞表面への吸着が起きる。細胞吸着に関わる因子としてはこれまでに複数の分子が報告されており、DC-SIGNやL-SIGN、ASGPR-1、hMGLなどのC型レクチンやTIM-1などが挙げられる^{1, 32) 36) 37,38) 39) 40) 41) 42) 43)}。細胞表面への吸着後はマクロピノサイトーシスによりエンドソーム・リソソームへと取り込まれる⁴⁴⁾。TAM familyチロシンキナーゼ受容体はマクロピノサイトーシスを促進することによるフィロウイルス細胞侵入への関与が示唆されている^{45) 46)}。GPはエンドソーム・リソソーム内でカテプシン等による蛋白質分解を受けることでMLDとglycan cap領域を含む部位をGPから遊離させ、受容体結合部位が露出されCleaved型となる⁴⁷⁾。 β 1-インテグリンはGPプロセッシングに関わるプロテアーゼの成熟を介した細胞侵入への関わりが示唆されている^{48) 49)}。Cleaved型となったGPはエンドソーム・リソソーム特異的に局在するNiemann-Pick C1(NPC1)受容体に結合する^{50) 51)}。最終的にNPC-1受容体結合に伴いGP蛋白質が構造を変化させることで細胞内へと侵入すると考えられている⁵²⁾。この他フィロウイルスでは、抗体がGPの機能がないう部分に結合することで生じる抗体依存性感染増強(Antibody-dependent enhancement, ADE)と呼ばれる現象による細胞侵入も報告されている^{53) 54)}。

我々は2015年にX線結晶構造解析を用いることで、マー

ルブルグウイルス GP 蛋白質の構造を解明することに成功した (図 3A)⁵⁵⁾。エボラウイルスとマールブルグウイルスでは宿主プロテアーゼに対する GP プロセッシングの反応性や翻訳後修飾, 免疫応答などに違いがあることが報告・示唆されているが^{4,56) 57) 58,59)}, GP の構造を比較するとそれらの現象に影響すると考えられる領域にはいくつかの構造的な違いが確認できた⁵⁵⁾。特に大きな違いとしては, GP1 の C 末端 (宿主プロテアーゼに切断される領域周辺) で, マールブルグウイルスにはエボラウイルス GP にはないアルファヘリックスが確認できた。このアルファヘリックスはマールブルグウイルス GP2 の Fusion loop 部分を安定化するような配置ともなっており, エボラウイルスとの宿主プロテアーゼに対する反応性の違いに構造的な影響を与えていると考えられた。さらに, 立体構造上, エボラウイルス GP1 の N 末端部分に相当する領域には, マールブルグウイルスでは GP2 の N 末端が位置しており, エボラ・マールブルグウイルス間の受容体結合部位の露出状況に影響を与えていると考えられた。エボラウイルスの受容体結合部位は Glycan cap と MLD によってその大部分が覆われているため, 宿主プロテアーゼに切断を受けた後にしか受容体結合部位は露出しない。一方で, マールブルグウイルスの受容体結合部位は一部のみが Glycan cap と MLD によって覆われており, 宿主プロテアーゼ切断前から部分的に受容体結合部位が露出していると思われる。

構造解析において我々は, エボラ・マールブルグウイルスに交差反応性がある抗体 (MR78) との複合体としてエボラ・マールブルグウイルスの両 GP との構造を決定した⁵⁵⁾。興味深いことに, MR78 とマールブルグウイルス GP の結合様式は, Glycan cap とエボラウイルス GP の相互作用を模した結合になっていることが確認できた。また, MR78 はマールブルグウイルス GP と NPC-1 との相互作用を効率的に阻害したため, 抗体結合部位は受容体結合部位と重なると推測された。この予想される受容体結合部位はフィロウイルス間で約 85% もの相同性を示した。実際, 2016 年になってエボラウイルス GP と NPC-1 ドメイン C 領域との複合体構造が解かれたことで, 予想受容体結合領域が確かに NPC-1 受容体結合部位であることが確認でき, さらに, MR78 の結合様式と NPC-1 受容体の結合様式が似ていることも明らかとなった⁶⁰⁾。

抗体によるエボラ・マールブルグウイルスの中和

我々は 2015 年に X 線結晶構造解析と合わせて X 線小角散乱解析により, MLD を含むエボラ・マールブルグウイルス GP の細胞外領域全体の構造決定も行った (図 3A,B)⁵⁵⁾。フィロウイルス GP の細胞外領域の構造は GP コア構造と MLD の二つに大きく分けることができる。X 線結晶構造解析の結果, 両ウイルスの GP コア構造は細かな違いが有りながらも同じ folding をしていることが確認できた。そ

して, X 線小角散乱解析の結果, コア構造から伸びる MLD の配置と向きがエボラ・マールブルグウイルスでは異なっていることが明らかとなった。エボラウイルス GP では MLD が受容体結合部位周辺を覆いながら斜め上に向かって伸びていた。そのため, 受容体結合部位周辺には抗体が出来にくく, base と呼ばれる下側面 (膜融合を担う GP2 サブユニット周辺) が露出した構造となっている。すなわち, この base 領域に効果的に膜融合を阻害する中和抗体が出来やすいと考えられた (図 3B)。2015 年以降研究が進み多くの抗体が報告されているが, これまでに報告されているコア部分に対する中和抗体のほとんどは MLD が伸びている領域以外に結合する⁶¹⁻⁶⁵⁾。一方, マールブルグウイルス GP では MLD が横方向に向かって伸びていた。そのため, 受容体結合部位周辺に邪魔するものがなく, この領域周辺に抗体が出来易い構造となっている。すなわち, この受容体結合領域に効果的に中和抗体が出来やすいと考えられた (図 3A)^{55,66)}。

エボラ・マールブルグウイルス GP の MLD の配置が異なるという構造解析結果は, 我々の行った抗体作製の結果とも一致する。マールブルグウイルス GP を免疫抗原として抗体を取得すると, 数は少ないがエボラウイルスにも結合できる能力がある抗体が産生された^{66,67)}。その理由としては, GP 上の受容体結合部位周辺のアミノ酸配列はフィロウイルス間で高度に保存されていることが立体構造上で示されている⁵⁵⁾。前述したように, マールブルグウイルス GP では MLD が受容体結合部位周辺を阻害しない位置にあるため, フィロウイルス間で交差反応性のある抗体が産生可能であると考えられる。しかし, エボラウイルス GP では MLD が受容体結合部位周辺を覆ってしまう位置にあるため, 交差反応性のある抗体の産生は難しいと考えられる。これまでにエボラウイルス GP を免疫抗原として取得された抗体では両ウイルスに結合できる抗体の報告はない。

マールブルグウイルス GP は非常に不安定な蛋白質であったため, 構造解析を行うために安定化する必要があった。300 以上のコンストラクトを作成して安定化と構造解析に成功できたが, 他にも思わぬ利点があった。構造解析が可能に安定化された蛋白質を免疫抗原として抗体を取得すると, 比較的高確率で感染防御能の高い抗体を得ることができ, 中にはマウス実験で 100% の防御能を示す抗体もあった⁶⁷⁾。抗体の取得という点からも抗原構造の情報活用は有効であると思われる。

おわりに

構造生物学的なアプローチにより原子レベルで構造解析を行うと, ゲノム配列上の麻疹・ムンプスウイルス H/HN や, エボラ・マールブルグウイルス GP からは引き出せない情報も得ることができる。本研究では, 基本的な

folding が同じでも構造的な差異が、抗体による中和メカニズムの違いや細胞侵入時の受容体認識・蛋白質分解酵素に対する結合・反応性の違いに現れていると考えられる結果を得ることが出来た。我々はウイルスの細胞侵入機構や抗体による中和機構の解明のために構造生物学的手法を活用してきたが、Structure-based Drug Design (SBDD) に代表されるように構造情報は創薬にも結びつきやすい。今後は構造情報に基づく治療法開発にも力を注ぎ、ウイルス学分野における構造解析や構造に基づく創薬研究の技術協力・提供が出来るように努力していきたい。

謝 辞

本研究に関しまして、大学院生時代からの恩師である九州大学の柳雄介先生をはじめ、多くの先生方にご指導いただきましたことに心より感謝申し上げます。非常に幸運なことに、私は柳先生にはウイルス学をご指導頂き、構造解析技術に関しては、北海道大学の前仲勝実先生に一からご指導いただき、大学院生時代2人の恩師に恵まれました。また、留学時には米国スクリプス研究所のErica Saphire先生にPIとしての振る舞いも含めて効率的な研究遂行の方法をご教授頂きました。研究を進めるにあたっては、多くの先輩や同僚、後輩にも恵まれ、沢山のアドバイスを頂きました。この場を借りて深くお礼を申し上げます。PIとしてプロジェクトを進めるにあたっては、これまでの恩師3人に加え、筑波大学の竹内薫先生や香川大学の中北慎一先生、中部大学の鈴木康夫先生、北里生命科学研究所の中山哲夫先生ら、その他多くの方々にご指導・ご協力を頂きましたこと、大変感謝いたしております。

今回の受賞で、書ききれていない多くの方々に大変お世話になって、今の研究が続けられていることを改めて確認することができました。今後とも何卒宜しくお願い致します。最後に、杉浦奨励賞にご推薦頂いた柳雄介先生と野田岳志先生、選考委員の先生方に深く感謝申し上げます。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Griffin DE. Measles virus, p. 1042-1069. *In* Knipe DM, Howley PM, J.I. C, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, V.R. R, Roizman B (ed.), *Fields Virology*. 6 ed., vol. I. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013.
- 2) World Health Organization. Measles. 2017.
- 3) Rubin SA, Sauder CJ, Carbone KM. Mumps Virus, p. 1024-1041. *In* Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B (ed.), *Fields Virology*. 6 ed., vol. I. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013.
- 4) Feldmann H, Sanchez A, Geisbert TW. Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses, p. 923-956. *In* Knipe DM, Howley PM, J.I. C, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, V.R. R, Roizman B (ed.), *Fields Virology*. 6 ed., vol. I. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013.
- 5) World Health Organization. Ebola Situation Reports. 2016.
- 6) Qiu X, Wong G, Audet J, Bello A, Fernando L, Alimonti JB, Fausther-Bovendo H, Wei H, Aviles J, Hiatt E, Johnson A, Morton J, Swope K, Bohorov O, Bohorova N, Goodman C, Kim D, Pauly MH, Velasco J, Pettitt J, Olinger GG, Whaley K, Xu B, Strong JE, Zeitlin L, Koberinger GP. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* 514:47-53. 2014.
- 7) Lyon GM, Mehta AK, Varkey JB, Brantly K, Plyler L, McElroy AK, Kraft CS, Towner JS, Spiropoulou C, Stroher U, Uyeki TM, Ribner BS, Emory Serious Communicable Diseases U. Clinical care of two patients with Ebola virus disease in the United States. *The New England journal of medicine* 371:2402-2409. 2014.
- 8) Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406: 893-897. 2000.
- 9) Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, Tsao MS, Richardson CD. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog* 7:e1002240. 2011.
- 10) Muhlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Pruffer S, Uhlig KM, Leonard VH, Navaratnarajah CK, Frenzke M, Wong XX, Sawatsky B, Ramachandran S, McCray PB, Cichutek K, von Messling V, Lopez M, Cattaneo R. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature*. 2011.
- 11) Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, Hashiguchi T. Measles virus receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 329:13-30. 2009.
- 12) Takeda M, Tahara M, Hashiguchi T, Sato TA, Jinnouchi F, Ueki S, Ohno S, Yanagi Y. A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism. *J Virol* 81:12091-12096. 2007.
- 13) Leonard VH, Sinn PL, Hodge G, Miest T, Devaux P, Oezguen N, Braun W, McCray PB, Jr., McChesney MB, Cattaneo R. Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest* 118:2448-2458. 2008.
- 14) Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* 67:6025-6032. 1993.
- 15) Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75:295-305. 1993.
- 16) Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, Kohda D, Yanagi Y, Maenaka K. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19535-19540. 2007.

- 17) Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. *Nat Struct Mol Biol* 18:135-141. 2011.
- 18) Hashiguchi T, Maenaka K, Yanagi Y. Measles virus hemagglutinin: structural insights into cell entry and measles vaccine. *Frontiers in microbiology* 2:247. 2011.
- 19) Nakashima M, Shirogane Y, Hashiguchi T, Yanagi Y. Mutations in the putative dimer-dimer interfaces of the measles virus hemagglutinin head domain affect membrane fusion triggering. *J Biol Chem* 288:8085-8091. 2013.
- 20) Kubota M, Takeuchi K, Watanabe S, Ohno S, Matsuo-ka R, Kohda D, Nakakita SI, Hiramatsu H, Suzuki Y, Nakayama T, Terada T, Shimizu K, Shimizu N, Shiroishi M, Yanagi Y, Hashiguchi T. Trisaccharide containing alpha2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016.
- 21) de Swart RL, Yuksel S, Osterhaus AD. Relative contributions of measles virus hemagglutinin- and fusion protein-specific serum antibodies to virus neutralization. *J Virol* 79:11547-11551. 2005.
- 22) Rubin SA, Link MA, Sauder CJ, Zhang C, Ngo L, Rima BK, Duprex WP. Recent mumps outbreaks in vaccinated populations: No evidence of immune escape. *J. Virol.* 86:615-620. 2012.
- 23) Rydbeck R, Löve A, Örvell C, Norrby E. Antigenic variation of envelope and internal proteins of mumps virus strains detected with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 67:281-287. 1986.
- 24) Örvell C, Alsheikhly AR, Kalantari M, Johansson B. Characterization of genotype-specific epitopes of the HN protein of mumps virus. *J. Gen. Virol.* 78 3187-3193. 1997.
- 25) Latner DR, Hickman CJ. Remembering mumps. *PLoS Pathog.* 11:e1004791. 2015.
- 26) Yoshida N, Fujino M, Miyata A, Nagai T, Kamada M, Sakiyama H, Ihara T, Kumagai T, Okafuji T, Okafuji T, Nakayama T. Mumps virus reinfection is not a rare event confirmed by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J. Med. Virol.* 80:517-523. 2008.
- 27) Sanchez A, Trappier SG, Mahy BW, Peters CJ, Nichol ST. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:3602-3607. 1996.
- 28) Sanchez A, Trappier SG, Stroher U, Nichol ST, Bowen MD, Feldmann H. Variation in the glycoprotein and VP35 genes of Marburg virus strains. *Virology* 240:138-146. 1998.
- 29) Volchkov VE, Volchkova VA, Stroher U, Becker S, Dolnik O, Cieplik M, Garten W, Klenk HD, Feldmann H. Proteolytic processing of Marburg virus glycoprotein. *Virology* 268:1-6. 2000.
- 30) Jeffers SA, Sanders DA, Sanchez A. Covalent modifications of the ebola virus glycoprotein. *Journal of virology* 76:12463-12472. 2002.
- 31) Manicassamy B, Wang J, Rumschlag E, Tymen S, Volchkova V, Volchkov V, Rong L. Characterization of Marburg virus glycoprotein in viral entry. *Virology* 358:79-88. 2007.
- 32) Takada A, Fujioka K, Tsuiji M, Morikawa A, Higashi N, Ebihara H, Kobasa D, Feldmann H, Irimura T, Kawaoka Y. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *Journal of virology* 78:2943-2947. 2004.
- 33) Yang ZY, Duckers HJ, Sullivan NJ, Sanchez A, Nabel EG, Nabel GJ. Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nature medicine* 6:886-889. 2000.
- 34) Francica JR, Varela-Rohena A, Medvec A, Plesa G, Riley JL, Bates P. Steric shielding of surface epitopes and impaired immune recognition induced by the ebola virus glycoprotein. *PLoS pathogens* 6:e1001098. 2010.
- 35) Noyori O, Matsuno K, Kajihara M, Nakayama E, Igarashi M, Kuroda M, Isoda N, Yoshida R, Takada A. Differential potential for envelope glycoprotein-mediated steric shielding of host cell surface proteins among filoviruses. *Virology* 446:152-161. 2013.
- 36) Alvarez CP, Lasala F, Carrillo J, Muniz O, Corbi AL, Delgado R. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *Journal of virology* 76:6841-6844. 2002.
- 37) Gramberg T, Hofmann H, Moller P, Lalor PF, Marzi A, Geier M, Krumbiegel M, Winkler T, Kirchhoff F, Adams DH, Becker S, Munch J, Pohlmann S. LSECtin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology* 340:224-236. 2005.
- 38) Becker S, Spiess M, Klenk HD. The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *The Journal of general virology* 76 (Pt 2):393-399. 1995.
- 39) Adachi H, Takano K, Morikawa M, Kanaya S, Yoshimura M, Mori Y, Sasaki T. Application of a two-liquid system to sitting-drop vapour-diffusion protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59:194-196. 2003.
- 40) Marzi A, Moller P, Hanna SL, Harrer T, Eisemann J, Steinkasserer A, Becker S, Baribaud F, Pohlmann S. Analysis of the interaction of Ebola virus glycoprotein with DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) and its homologue DC-SIGNR. *The Journal of infectious diseases* 196 Suppl 2:S237-246. 2007.
- 41) Marzi A, Gramberg T, Simmons G, Moller P, Rennekamp AJ, Krumbiegel M, Geier M, Eisemann J, Turza N, Saunier B, Steinkasserer A, Becker S, Bates P, Hofmann H, Pohlmann S. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of virology* 78:12090-12095. 2004.
- 42) Kondratowicz AS, Lennemann NJ, Sinn PL, Davey RA, Hunt CL, Moller-Tank S, Meyerholz DK, Rennert P,

- Mullins RF, Brindley M, Sandersfeld LM, Quinn K, Weller M, McCray PB, Jr., Chiorini J, Maury W. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:8426-8431. 2011.
- 43) Kuroda M, Fujikura D, Nanbo A, Marzi A, Noyori O, Kajihara M, Maruyama J, Matsuno K, Miyamoto H, Yoshida R, Feldmann H, Takada A. Interaction between TIM-1 and NPC1 Is Important for Cellular Entry of Ebola Virus. *Journal of virology* 89:6481-6493. 2015.
 - 44) Nanbo A, Imai M, Watanabe S, Noda T, Takahashi K, Neumann G, Halfmann P, Kawaoka Y. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS pathogens* 6:e1001121. 2010.
 - 45) Shimojima M, Takada A, Ebihara H, Neumann G, Fujioka K, Irimura T, Jones S, Feldmann H, Kawaoka Y. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *Journal of virology* 80:10109-10116. 2006.
 - 46) Brindley MA, Hunt CL, Kondratowicz AS, Bowman J, Sinn PL, McCray PB, Jr., Quinn K, Weller ML, Chiorini JA, Maury W. Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein. *Virology* 415:83-94. 2011.
 - 47) Chandran K, Sullivan NJ, Felbor U, Whelan SP, Cunningham JM. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* 308:1643-1645. 2005.
 - 48) Takada A, Watanabe S, Ito H, Okazaki K, Kida H, Kawaoka Y. Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology* 278:20-26. 2000.
 - 49) Schornberg KL, Shoemaker CJ, Dube D, Abshire MY, Delos SE, Bouton AH, White JM. Alpha5beta1-integrin controls ebolavirus entry by regulating endosomal cathepsins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:8003-8008. 2009.
 - 50) Carette JE, Raaben M, Wong AC, Herbert AS, Obernosterer G, Mulherkar N, Kuehne AI, Kranzusch PJ, Griffin AM, Ruthel G, Dal Cin P, Dye JM, Whelan SP, Chandran K, Brummelkamp TR. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* 477:340-343. 2011.
 - 51) Cote M, Misasi J, Ren T, Bruchez A, Lee K, Filone CM, Hensley L, Li Q, Ory D, Chandran K, Cunningham J. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* 477:344-348. 2011.
 - 52) Brecher M, Schornberg KL, Delos SE, Fusco ML, Saphire EO, White JM. Cathepsin cleavage potentiates the Ebola virus glycoprotein to undergo a subsequent fusion-relevant conformational change. *Journal of virology* 86:364-372. 2012.
 - 53) Takada A, Feldmann H, Ksiazek TG, Kawaoka Y. Antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection. *Journal of virology* 77:7539-7544. 2003.
 - 54) Nakayama E, Tomabechei D, Matsuno K, Kishida N, Yoshida R, Feldmann H, Takada A. Antibody-dependent enhancement of Marburg virus infection. *The Journal of infectious diseases* 204 Suppl 3:S978-985. 2011.
 - 55) Hashiguchi T, Fusco ML, Bornholdt ZA, Lee JE, Flyak AI, Matsuoka R, Kohda D, Yanagi Y, Hammel M, Crowe JE, Jr., Saphire EO. Structural basis for Marburg virus neutralization by a cross-reactive human antibody. *Cell* 160:904-912. 2015.
 - 56) Funke C, Becker S, Dartsch H, Klenk HD, Muhlberger E. Acylation of the Marburg virus glycoprotein. *Virology* 208:289-297. 1995.
 - 57) Valmas C, Grosch MN, Schumann M, Olejnik J, Martinez O, Best SM, Kraehling V, Basler CF, Muhlberger E. Marburg virus evades interferon responses by a mechanism distinct from ebola virus. *PLoS pathogens* 6:e1000721. 2010.
 - 58) Gnirss K, Kuhl A, Karsten C, Glowacka I, Bertram S, Kaup F, Hofmann H, Pohlmann S. Cathepsins B and L activate Ebola but not Marburg virus glycoproteins for efficient entry into cell lines and macrophages independent of Tmprss2 expression. *Virology* 424:3-10. 2012.
 - 59) Misasi J, Chandran K, Yang JY, Considine B, Filone CM, Cote M, Sullivan N, Fabozzi G, Hensley L, Cunningham J. Filoviruses require endosomal cysteine proteases for entry but exhibit distinct protease preferences. *Journal of virology* 86:3284-3292. 2012.
 - 60) Wang H, Shi Y, Song J, Qi J, Lu G, Yan J, Gao GF. Ebola Viral Glycoprotein Bound to Its Endosomal Receptor Niemann-Pick C1. *Cell* 164:258-268. 2016.
 - 61) Lee JE, Fusco ML, Hessel AJ, Oswald WB, Burton DR, Saphire EO. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature* 454:177-182. 2008.
 - 62) Dias JM, Kuehne AI, Abelson DM, Bale S, Wong AC, Halfmann P, Muhammad MA, Fusco ML, Zak SE, Kang E, Kawaoka Y, Chandran K, Dye JM, Saphire EO. A shared structural solution for neutralizing ebolaviruses. *Nat Struct Mol Biol* 18:1424-1427. 2011.
 - 63) Bale S, Dias JM, Fusco ML, Hashiguchi T, Wong AC, Liu T, Kuehne AI, Li S, Woods VL, Jr., Chandran K, Dye JM, Saphire EO. Structural basis for differential neutralization of ebolaviruses. *Viruses* 4:447-470. 2012.
 - 64) Murin CD, Fusco ML, Bornholdt ZA, Qiu X, Olinger GG, Zeitlin L, Kobinger GP, Ward AB, Saphire EO. Structures of protective antibodies reveal sites of vulnerability on Ebola virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:17182-17187. 2014.
 - 65) Bornholdt ZA, Turner HL, Murin CD, Li W, Sok D, Souders CA, Piper AE, Goff A, Shamblin JD, Wollen SE, Sprague TR, Fusco ML, Pommert KB, Cavacini LA, Smith HL, Klempner M, Reimann KA, Krauland E, Gerngross TU, Wittrup KD, Saphire EO, Burton DR, Glass PJ, Ward AB, Walker LM. Isolation of potent neutralizing antibodies from a survivor of the 2014

- Ebola virus outbreak. *Science* 351:1078-1083. 2016.
- 66) Flyak AI, Ilinykh PA, Murin CD, Garron T, Shen X, Fusco ML, Hashiguchi T, Bornholdt ZA, Slaughter JC, Sapparapu G, Klages C, Ksiazek TG, Ward AB, Saphire EO, Bukreyev A, Crowe JE, Jr. Mechanism of human antibody-mediated neutralization of marburg virus. *Cell* 160:893-903. 2015.
- 67) Fusco ML, Hashiguchi T, Cassan R, Biggins JE, Murin CD, Warfield KL, Li S, Holtsberg FW, Shulenin S, Vu H, Olinger GG, Kim DH, Whaley KJ, Zeitlin L, Ward AB, Nykiforuk C, Aman MJ, Berry JD, Saphire EO. Protective mAbs and Cross-Reactive mAbs Raised by Immunization with Engineered Marburg Virus GPs. *PLoS pathogens* 11:e1005016. 2015.

Molecular basis for negative-strand RNA virus entry and neutralization by antibodies

Takao HASHIGUCHI

Affiliation; Department of Virology, Faculty of medicine, Kyushu University.
3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka, Japan, 812-8582

Mononegaviruses are non-segmented negative-strand RNA viruses, and include measles, mumps, Marburg, and Ebola viruses. Measles virus and mumps virus, members of the family *Paramyxoviridae*, are immunotropic and neurotropic, respectively. Marburg virus and Ebola virus, members of the family *Filoviridae*, cause highly lethal hemorrhagic fever. In this paper, I summarize the recent structural and functional studies on the viral glycoproteins (GPs) of these viruses, which have shed light on virus entry and the humoral response. The structural and functional analyses of the interaction between viral GPs and receptors/antibodies also illuminate directions toward therapeutics against the viruses.